

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/11, 15/29, 15/82, 1/21, 5/10, A01H 5/06, 5/00, 5/10, C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/29566 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Mai 2000 (25.05.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08786 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. November 1999 (16.11.99)		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: 198 52 757.8 16. November 1998 (16.11.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): ETH ZÜRICH [CH/CH]; Rämistrasse 101, CH-8092 Zürich (CH).			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: RIESMEIER, Jörg [DE/DE]; Ludwigsfelder Strasse 16, D-14165 Berlin (DE). WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Arnold-Knoblauch-Ring 1, D-14109 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUCHER, Marcel [CH/CH]; Rieterstr. 40, CH-8404 Winterthur (CH).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).			

(54) Title: PROMOTERS FOR GENE EXPRESSION IN THE ROOTS OF PLANTS**(54) Bezeichnung:** PROMOTOREN ZUR GENEXPRESSSION IN WURZELN VON PFLANZEN**(57) Abstract**

The present invention relates to promoters effecting root-specific expression of coding nucleotide sequences controlled thereby and expression cassettes, recombinant vectors and microorganisms that contain such promoters. The invention also relates to transformed transgenic plants, in addition to a method for the production and a method for the isolation of root-specific promoters.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung stellt Promotoren bereit, die eine wurzelspezifische Expression von ihnen kontrollierter codierender Nucleotidsequenzen bewirken und Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Mikroorganismen, die solche Promotoren umfassen. Ferner werden transformierte transgene Pflanzen beschrieben, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Verfahren zur Isolierung wurzelspezifischer Promotoren.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Promotoren zur Genexpression in Wurzeln von Pflanzen**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die eine wurzelspezifische Expression von ihnen kontrollierter codierender Nucleotidsequenzen bewirken, zur gewebespezifischen Genexpression in Pflanzen, Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Mikroorganismen, die solche Promotoren umfassen, damit transformierte transgene Pflanzen, ein Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen sowie ein Verfahren zur Isolierung wurzelspezifischer Promotoren.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in dieser Anmeldung enthalten ist.

Der Einsatz von Pflanzen, die mit Hilfe gentechnischer Verfahren in ihrem Erbgut verändert wurden, hat sich in vielen Bereichen der Landwirtschaft als vorteilhaft und oft als der einzige Weg erwiesen, bestimmte Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen. Die vornehmlichen Ziele sind zum einen der Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitätssteigerung der erntbaren Produkte.

Es sind zahlreiche Verfahren zur genetischen Modifikation dikotyler und monokotyler Pflanzen bekannt (vgl. u.a. Gasser und Fraley, *Science* 244 (1989), 1293-1299; Potrykus, *Ann. Rev. Plant mol. Biol. Plant Physiol.* 42 (1991), 205-225). Alle Verfahren basieren auf der Übertragung von Genkonstrukten, die in den meisten Fällen Neukombinationen von bestimmten codierenden Regionen von Strukturgenen mit Promotorregionen anderer Strukturgene, sowie Transkriptionsterminatoren darstellen.

Die Bereitstellung von Promotoren ist dabei von großer Bedeutung für die Herstellung von transgenen Pflanzen, da die Spezifität eines Promoters ausschlaggebend dafür ist, zu welchem Zeitpunkt, in welchen Gewebetypen und in welcher Intensität ein gentechnisch übertragenes Strukturgen exprimiert wird.

Eine Vielzahl von Promotoren, die die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern, ist bekannt. Der am häufigsten verwendete Promotor ist der 35S CaMV-Promotor (Franck et al., Cell 1 (1980), 285-294), der zu einer konstitutiven Expression des eingeführten Gens führt.

Häufig werden aber auch induzierbare Promotoren eingesetzt, beispielsweise zur Wundinduktion (DE-A-3843628), chemischen Induktion (Ward et al., Plant Molec. Biol. 22 (1993), 361-366) oder Lichtinduktion (Fluhr et al., Science 232 (1986), 1106-1112).

Auch die Verwendung zell- und gewebespezifischer Promotoren wurde beschrieben: schließzellenspezifische Genexpression (DE-A-4207358), samen-, knollen- und fruchtspezifische Genexpression (zusammengefaßt in Edwards and Coruzzi, Annu. Rev. Genet. 24 (1990), 275-303; DE-A-3843627), phloemspezifische Genexpression (Schmülling et al., Plant Cell 1 (1989), 665-670), wurzelknöllchenspezifische Genexpression (DE-A-3702497) oder meristemspezifische Genexpression (Ito et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 863-878).

Beispiele für Promotoren, die die Genexpression in Wurzel vermitteln, sind der Class-II-Patatin-Promotor (Köster-Töpfer et al., Mol. Gen. Genet. 219 (1989), 390-396), der nach Fusion mit dem Reportergen des β -Glucuronidase (GUS)-Gens eine hohe Expression in Kartoffelknollen und in bestimmten Zellschichten von Wurzelspitzen zeigt. Auch GUS-Fusionsexperimente mit dem Agropinsynthase-Promotor (ags) (Inoguchi et al., Plant Phys. 149 (1996), 73-78) zeigten eine hohe GUS-Aktivität vor allem in Wurzeln. Transgene *Arabidopsis*-Pflanzen enthaltend ein AKT1 (= Kaliumkanal)-GUS-Konstrukt (Lagarde et al., Plant J. 9 (1996), 195-203) führten vor allem zu einer Expression in äußeren Zellschichten reifer Wurzelabschnitte. Auch ein 636 bp langer Abschnitt des 5'-Bereiches des TobRB7 (= Wasserkanal)-Gens (Yamamoto et al., Plant Cell 3 (1991), 371-382) vermittelte eine wurzelspezifische GUS-Expression in transgenen Tabakpflanzen. Ferner wurden GUS-Fusionsexperimente mit dem Promotor eines Extensingens beschrieben, wobei GUS-Aktivität in Sojabohnenkeimlingen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium im Hypocotyl und in der Wurzel bzw. spezifischen Zonen der Wurzel nachgewiesen werden konnte (Ahn et al., Plant Cell 8 (1996), 1477-1490).

Die Verwendung der beschriebenen Promotoren ist oft problematisch. Promotoren, die eine konstitutive Expression der von ihnen kontrollierten Gene bewirken, können beispielsweise zur Erzeugung herbizidtoleranter und pathogenresistenter Pflanzen eingesetzt werden, haben

aber den Nachteil, daß die Produkte der von ihnen kontrollierten Gene in allen Teilen der Pflanze vorliegen, auch in den geernteten Pflanzenteilen, was in manchen Fällen unerwünscht sein kann. Induzierbare Promotoren sind gleichfalls nicht unproblematisch, da die Induktionsbedingungen bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen im Freiland typischerweise schwer kontrollierbar sind.

Darüberhinaus ist es zur Bewältigung verschiedener Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen erforderlich, Gene, die unterschiedlich reguliert werden sollen, unter die Kontrolle verschiedener Promotoren zu stellen. Es ist daher notwendig, verschiedene Promotorsysteme mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung zu stellen.

Promotoren, die die Genexpression in Wurzeln regulieren sind bisher nur in begrenzter Zahl bekannt. Zur Bewältigung bestimmter Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen ist es erforderlich, weitere, alternative Promotorsysteme zur Genexpression in Wurzeln zur Verfügung zu stellen, die im Vergleich zu den bekannten Systemen unterschiedlich reguliert sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine organspezifische, vorzugsweise wurzelspezifische Genexpression von Pflanzen ermöglichen. Diese Mittel sollten beispielsweise zur Expression von Genen, die die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden beeinflussen, und von Genen, die das Wurzelwachstum modifizieren, geeignet sein.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung einen Promotor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Promotoren, die die unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 , SEQ ID No. 4 , SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebene Nucleinsäuresequenz umfassen;
- b) Promotoren, die einen funktionalen Teil der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 , SEQ ID No. 4 , SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebenen Nucleinsäuresequenz umfassen und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken;

- c) Promotoren, die eine Sequenz aufweisen, die mit einer der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 , SEQ ID No. 4 , SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 gezeigten hybridisiert, und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken; und
- d) Promotoren von Genen, die Proteine codieren deren Aminosäuresequenzen eine Homologie von mindestens 60 % zu der unter SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen, wobei diese Promotoren in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Promotoren solche von pflanzlichen Genen oder von solchen abgeleitet.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem "Promotor" eine DNA-Sequenz verstanden, die den regulatorischen Anteil eines Gens, vorzugsweise eines Strukturgens, umfaßt. Unter dem "regulatorischen Anteil" eines Gens wird derjenige Anteil verstanden, der die Expression des Gens bestimmt. Ein regulatorischer Anteil besitzt ein Sequenzmotiv, an dem Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase assemblieren und die Transkription des codierenden Anteils des Gens einleiten. Darüber hinaus kann der regulatorische Anteil ein oder mehrere positive regulatorische Elemente, sogenannte Enhancer umfassen. Er kann zusätzlich oder an deren Stelle aber auch negativ regulatorische Elemente, sogenannte Silencer enthalten. Unter einem "Strukturgen" wird eine genetische Einheit aus regulatorischem und codierendem Anteil verstanden, deren Genprodukt ein Protein ist. Die Information für die primäre Aminosäuresequenz des Proteins ist im codierenden Anteil des Strukturgens enthalten, während der regulatorische Anteil bestimmt, wann und in welchen Geweben zu welchen Mengen das Transkript des codierenden Anteils gebildet wird, nach dessen Vorlage das Genprodukt synthetisiert wird. Die erfindungsgemäßen Promotoren können beispielsweise aus pflanzlichen Genen stammen, durch rekombinante DNA-Techniken modifiziert sein und/oder synthetisch hergestellt werden.

Unter dem Begriff "wurzelspezifisch" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß ein unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßen Promotors stehendes Fremdgen in den Wurzeln exprimiert wird. Insbesondere ist Wurzelspezifität im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch dann gegeben, wenn der erfindungsgemäße Promoter die Expression eines Fremdgens in den Wurzeln im Vergleich zu maturen Blättern begünstigt und in Wurzeln eine signifikant, wie beispielsweise mindestens 2- bis 5-fach, bevorzugt 5- bis 10-fach, besonders bevorzugt 10- bis 100fach erhöhte Expression bewirkt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann Wurzelspezifität durch Reportergen-Experimente analysiert werden. Zur Testung einer isolierten Promotorsequenz auf Promotoraktivität in Wurzeln kann der Promotor beispielsweise in einer Expressionskassette bzw. in einen Vektor zur Pflanzentransformation operativ mit einem Reportergen, wie z.B. dem β -Glucuronidasegen aus *E. coli*, verknüpft werden. Dieses Konstrukt wird zur Transformation von Pflanzen verwendet. Anschließend wird die Expression der β -Glucuronidase in Wurzeln im Vergleich zu maturen Blättern bestimmt, wie z.B. bei Martin et al. (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) beschrieben.

Der Begriff "Wurzel" ist dem Fachmann geläufig. Ergänzend sei verwiesen auf Strasburger (Lehrbuch der Botanik für Hochschulen: Begr. v. Eduard Strasburger u. a. Neubearb. v. Peter Sitte, Hubert Ziegler u. a., 34. Aufl., 1998, Fischer (Gustav)-Verlag, Stuttgart).

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein Promotor mit der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 dargestellten Nucleotidsequenz in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirkt.

Diese Beobachtung ist insbesondere überraschend, weil ein genomisches Fragment (SEQ ID No. 13) der Promotorregion (s. Beispiel 2), welches im Vergleich zur SEQ ID No. 1 um ca. 1000 bp verlängert ist, keine wurzelspezifische GUS-Expression vermitteln kann. Nur im Vergleich zum großen Fragment (SEQ ID No. 13) verkürzte Promotorfragmente (SEQ ID No. 1 bis 6), die wie in Beispiel 3C beschrieben hergestellt wurden, führen zu einer

wurzelspezifischen Genexpression einer vom Promotor kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz.

Untersucht man die Sequenz der cDNA (SEQ ID No. 7) so findet man im 5'-Bereich, upstream vom eigentlichen ATG (Pos. 256-258, SEQ ID No. 7), drei weitere ATG Translations-Initiations-Codons (Positionen 42-44, 65-67 und 142-144 von SEQ ID No. 7), die zu mehreren upstream open reading frames (uORFs) führen. Die Anwesenheit solcher uORFs kann einen negativen Einfluß auf die Translationsrate spezifischer mRNAs haben. Die verschiedenen Promotorfragmente werden vorzugsweise derart konstruiert, daß sie diesen 5'-upstream-Bereich (Pos. 1-255, SEQ ID No. 7) nicht umfassen.

Der erfindungsgemäße Promotor erlaubt nun eine wurzelspezifische Genexpression einer vom Promotor kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz. Er stellt eine interessante Alternative zu anderen wurzelspezifischen Promotoren dar, weil er auch die Genexpression in Wurzelhaaren vermitteln kann. Aufgrund der größeren Oberfläche der Wurzelhaare im Vergleich zur Wurzel besteht die Möglichkeit, daß mit Hilfe des erfindungsgemäßen Promotors die Expression von solchen Genen effektiver manipuliert werden kann, deren Genprodukte beispielsweise den Transport von Nährstoffen und Metaboliten durch die Wurzelhaarzellen vermitteln.

Vielfältige Verwendungsmöglichkeiten stehen für den erfindungsgemäßen Promotor zur Verfügung. Beispielsweise kann man sich die Herstellung transgener Pflanzen vorstellen, die aufgrund eines modifizierten Wurzelhaarmetabolismus, der einen positiven Einfluß auf die Flora der Wurzelumgebung (Rhizosphäre) ausübt, einen erhöhten Ertrag zeigen. Darüberhinaus kann man die erfindungsgemäßen Promotoren zur wurzelspezifischen Expression solcher Gene verwenden, die die Aufnahme beispielsweise von Schwermetallionen aus kontaminierten Böden vermitteln. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Promotors wäre es somit möglich, transgene Pflanzen herzustellen, die bei der Phytoremediation eingesetzt werden können.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erlauben die erfindungsgemäßen Promotoren, die Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz in spezifischen Wurzelzellen, wie z.B. in Wurzelzellen der Primärwurzel, in Wurzelhaaren der

Primärwurzel, in Wurzelzellen der Wurzelspitze oder in Wurzelhaaren der Primärwurzel unterhalb des Hypocotyls, zu bewirken.

Neben einem Promotor, der die gesamte unter SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 dargestellte Sequenz aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

Unter einem "funktionalen Teil" versteht man in diesem Zusammenhang solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nucleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, wie z.B. Promotoraktivität und Gewebe- oder Organspezifität besitzen. Ein Maß für die Promotoraktivität ist beispielsweise die für ein bestimmtes Markergen, das unter der regulativen Kontrolle des erfindungsgemäßen Promoters steht, ermittelte Expressionsrate. Beispiele für geeignete Markergene sind das β -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* oder das Green-Fluorescence-Protein-(GFP)-Gen (Baulcombe et al., Plant J. 7 (16) (1993), 1045-1053). Die Organ- bzw. Gewebespezifität lässt sich leicht durch Vergleich der an einzelnen Geweben bzw. Organen der Pflanze ermittelten Expressionsraten für obige Markergene bestimmen. Funktionale Teile der Promotorsequenzen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene Nucleotidsequenzen. Unter einem funktionalen Teil versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Promotorsequenz, welche weiterhin die gewünschten Funktionen zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nucleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nucleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebenen Nucleotidsequenz erhalten kann. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Promotorsequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsschnittstellen sein.

Funktionale Teile einer Promotorsequenz umfassen auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem Wildtyp, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Prinzipiell wird die Aktivität eines eukaryontischen RNA-Polymerase II-Promotors durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener *trans*-aktiver Faktoren (DNA-Bindepoteine) bedingt, welche an die verschiedenen im Promotor vorhandenen *cis*-regulatorischen DNA-Elemente binden. Diese Faktoren wechselwirken direkt oder indirekt mit einzelnen oder mehreren Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, was letztlich zur Ausbildung eines Präinitiationskomplexes in der Nähe der Transkriptionsstartstelle führt (Drapkin et al., Current Opinion in Cell Biology 5 (1993), 469-476). Man kann von einem modularen Aufbau eukaryontischer RNA-Polymerase II-Promotoren sprechen, wobei verschiedene *cis*-Elemente (Module) jeweils als Teilkomponenten die Gesamtaktivität des Promotors determinieren (Tjian und Maniatis, Cell 77 (1994), 5-8). Verdeutlicht wurde dieser modulare Aufbau beispielsweise durch Promotorstudien mit dem Blumenkohl-Mosaik-Virus-(CaMV)-35S-Promotor (Benfey und Chua, Science 250 (1990), 959-966; Benfey et al., EMBO J. 9 (1990), 1677-1684; Benfey et al., EMBO J. 9 (1990), 1685-1696). Aufgrund der unterschiedlichen Gewebespezifität, die verschiedene Restriktions-Subfragmente des -343 bis +8 (relativ zur Transkriptionsstartstelle) Promotors in transgenen Tabakpflanzen vermitteln, wurde der Promotor in 6 Subdomänen aufgeteilt. Die starke, konstitutive Expression, die der vollständige Promotor vermittelt, ist also in gewebespezifische Teilaktivitäten sektionierbar.

Einzelne, potentiell Gewebespezifität vermittelnde Subdomänen des erfindungsgemäßen Promotors können beispielsweise durch Fusion mit einer Minimalpromotor-Reportergen-Kassette identifiziert werden. Unter einem Minimalpromotor versteht man eine DNA-Sequenz, die eine TATA-Box, die sich etwa 20 bis 30 Basenpaare stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle befindet, oder eine Initiatorsequenz (Smale und Baltimore, Cell 57 (1989), 103-113; Zawel und Reinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. 44 (1993), 67-108; Conaway und Conaway, Annu. Rev. Biochem 62 (1993), 161-190) umfaßt. Beispiele für Minimalpromotoren sind beispielsweise der -63 bis +8 Δ35S-Promotor (Frohberg, Dissertation an der FU Berlin FB Biologie (1994)), der -332 bis +14 Minimal-Patatin-ClassI-Promotor sowie der -176 bis +4-Minimal-PetE-Promotor (Pwee et al., Plant J. 3 (1993), 437-449.)

Desweiteren können solche Subdomänen bzw. *cis*-Elemente des erfindungsgemäßen Promotors auch über Deletionsanalysen bzw. Mutagenesen identifiziert werden (Kawagoe et al., Plant J. 5(6) (1994), 885-890). Der Test auf Funktionalität einer solchen Subdomäne oder

cis-Elements kann *in planta* durch den Nachweis der Reporteraktivität in transformierten Zellen erfolgen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter dem funktionalen Teil der Promotorsequenz auch solche Subdomänen bzw. *cis*-Elemente der unter SEQ ID No.1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebenen Nucleotidsequenzen, die eine Wurzelspezifität vermitteln.

Ferner kann die Wirksamkeit einer Subdomäne oder eines *cis*-Elementes durch Multimerisierung deutlich verstärkt werden. Im Falle des CaMV-35S-Promotors führte beispielsweise die Dimerisierung eines 250 bp großen Fragmentes in Tandemanordnung zu einer Verzehnfachung der Promotoraktivität (Kay et al., Science 230 (1987), 1299-1302). Im Falle der Subdomäne B5 des CaMV-35S-Promotors zeigte sich eine deutliche Aktivitätssteigerung des Promotorkonstruktes für den Fall, daß diese Domäne als Tetramer und nicht als Monomer vorlag (Benfey et al., EMBO J. 9 (1990), 1685-1696).

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher insbesondere auch Di- und Multimere von Subdomänen bzw. *cis*-Elementen der unter SEQ ID No.1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebenen Nucleotidsequenzen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp durch die Kombination des erfindungsgemäßen Promotors mit einem sogenannten Enhancer erreicht.

In der Literatur sind verschiedene Enhancer beschrieben worden, die in der Regel eine gewebespezifische Erhöhung der Expression bewirken, wobei die Gewebespezifität in der Regel durch den jeweils verwendeten Enhancer determiniert wird (Benfey et al., Science 250 (1990), 959-966; Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202; Chen et al., EMBO J. 7, (1988), 297-302; Simpson et al., Nature 323 (1986), 551-554).

Darüberhinaus gibt es auch Enhancer, wie z.B. den PetE Enhancer (Sandhu et al., Plant Mol. Biol. 37 (1998), 885-896), die nicht gewebespezifisch wirken und somit als reine quantitative Verstärkerelemente vor den erfindungsgemäßen Promotor gesetzt werden können, um die Expression in Wurzeln zu erhöhen, ohne die Qualität der Gewebespezifität des erfindungsgemäßen Promotors zu verändern.

Ein wurzelspezifischer Enhancer, der auf der Multimerisierung einer bestimmten Box (Box II) basiert, wurde beispielsweise beschrieben in "DNA-Protein Interactions in the Auxin regulated Promoter of T-DNA gene 5" (Autor: Sirpa Nuotio, Acta Universitatis Ouluensis, A Scientiae Rerum Naturalium 299 (1997), Oulu University Press, S. 38 ff.). Ferner können auch synthetische Enhancer verwendet werden, die beispielsweise von natürlich vorkommenden Enhancern abgeleitet sind und/oder durch Kombination verschiedener Enhancer erhalten werden.

Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die eine Nucleotidsequenz aufweisen, die mit der unter SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 gezeigten Nucleotidsequenz hybridisieren und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken. Bevorzugt hybridisieren solche Sequenzen unter stringenten Bedingungen mit der unter SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 dargestellten Sequenz.

Der Ausdruck "stringente Bedingungen" bedeutet dabei vorzugsweise Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise beschrieben sind in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Insbesondere findet Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen statt:

Hybridisierungspuffer: 2x SSC; 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1); 0.1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringsperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 1mM EDTA, 7% SDS
Hybridisierungstemperatur T= 65 bis 68 °C;

Waschpuffer 0.2 x SSC; 0.1% SDS;

Waschtemperatur T = 65 bis 68° C.

Vorzugsweise weisen derartige Promotoren eine Sequenzidentität von mindestens 30%, bevorzugt von mindestens 40%, bevorzugt von mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 60%, insbesondere bevorzugt von mindestens 70% und vorteilhafterweise von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90% und insbesondere bevorzugt mindestens 95% zu der unter Seq ID No. 1 gezeigten Promotorsequenz oder Teilen davon auf. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit

der unter SEQ ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz bestimmt. Wenn zwei zu vergleichende Sequenzen eine unterschiedliche Länge aufweisen, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nucleotidreste der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den Nucleotidresten der längeren Sequenz. Die Sequenzidentität kann konventionell durch Verwendung von Computerprogrammen wie z. B. das Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) bestimmt werden. Bestfit nützt den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, um das Segment mit höchster Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen zu finden. Bei der Anwendung von Bestfit oder einem anderen Sequenz-Alignment-Programm zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% identisch ist mit einer Referenzsequenz der vorliegenden Erfindung, werden die Parameter vorzugsweise so eingestellt, daß der Prozentanteil der Identität über die gesamte Länge der Referenzsequenz berechnet wird und daß Homologielücken ("gaps") von bis zu 5% der Gesamtzahl der Nucleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind. Bei der Verwendung von Bestfit werden die sogenannten optionalen Parameter vorzugsweise bei ihren voreingestellten ("default") Werten belassen. Die Abweichungen, die bei dem Vergleich einer gegebenen Sequenz mit den oben beschriebenen Sequenzen der Erfindung auftreten, können beispielsweise durch Addition, Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination verursacht sein. Promotorsequenzen, die wie oben beschrieben mit der unter SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 gezeigten Nucleotidsequenz hybridisieren oder eine Sequenzidentität zu SEQ ID No. 1 aufweisen, stammen vorzugsweise aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus höheren Pflanzen, besonders bevorzugt aus dikotylen Pflanzen, insbesondere bevorzugt aus Pflanzen der Gattung *Lycopersicon*.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der erfindungsgemäße Promotor die gesamte unter SEQ ID No. 3 (ca. 1.4 kb-Fragment), SEQ ID No. 4 (ca. 1.1 kb-Fragment), SEQ ID No. 5 (0.9 kb-Fragment) oder SEQ ID No. 6 (0.55 kb-Fragment) dargestellte Sequenz auf.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil dieser Sequenzen aufweisen und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der erfindungsgemäße Promotor die gesamte oder einen funktionalen Teil der unter SEQ ID No. 4 (1.1 kb-Fragment) dargestellten Sequenz auf.

Ohne daran zu denken, an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, daß der unter SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 gezeigte Promotor von einem pflanzlichen Gen stammt, das zu einer Gruppe extensinähnlicher Proteine gehört.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Promotoren von Genen, die ein Protein, vorzugsweise aus der Gruppe der extensinähnlichen Proteine, codieren und die eine Homologie, d.h. Identität, von mindestens 60%, vorzugsweise von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere von mindestens 95% zu der gesamten unter SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen, wobei diese Promotoren in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Promotoren von Genen, die ein Protein mit der unter SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenz codieren, wobei diese Promotoren in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten Nucleotidsequenz bewirken.

Die unter SEQ ID No. 7 dargestellte Nucleotidsequenz codiert ein Polypeptid (SEQ ID No. 8) aus *L. esculentum*, von dem angenommen werden kann, daß es der Gruppe der extensinähnlichen Proteine zuzurechnen ist.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem extensinähnlichen Protein ein pflanzliches Protein verstanden, dessen Aminosäuresequenz mindestens eines der folgenden Sequenzmotive aufweist: SPPPPP, SPPPPYYY, SPPPPY, SPPPPVY, PPPPPYY, PPPPPSY, PPPPPTY, PPPPPAY, PPPPPEY, PPPPPXY, SOOOO, SPPPPKH, SPPPPKK,

SPPPPKKPYYPP, SPPPPSP, SPPPPSPKYVYK, SPPPPSPSPPPP, SPPPPYYYH, SPPPPYYYK, SOOOOTOVYK, SPPPPTPVYK, SOOOOVYK, SPPPPVYK, SPPPPVYSPPP, SPPPPVHSPPPVA, SPPPPVK, SPPPPVKSPPP, SOOOOVKP.

Insbesondere solche pflanzlichen Proteine, die mindestens eines in der SEQ ID No. 8 enthaltenen SPPP- und/oder (P)PPPYY-Motive aufweisen, werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als extensinähnlich bezeichnet.

DNA-Sequenzen, die Homologie zu der unter SEQ ID No. 7 gezeigten Sequenz aufweisen, können zum einen beispielsweise durch computergestützte Sequenzvergleiche mit bekannten Sequenzen identifiziert werden oder auch durch Durchmusterung von beispielsweise cDNA- oder genomischen Bibliotheken mit der unter SEQ ID No. 7 dargestellten Sequenz oder Teilen davon. Derartige Techniken sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., a.a.O.). Gleichfalls können computergestützte Sequenzvergleiche auch auf Aminosäureebene mit der in SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenz oder Teilen davon durchgeführt werden.

Die Zellwand beeinflußt sowohl die Form als auch die Funktion der Zelle. Die Proteinfraktion der Zellwand enthält sowohl Enzyme als auch Strukturproteine. Zu den am besten charakterisierten Strukturproteinen der Zellwand gehören die sogenannten Extensine (Cassab und Varner, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 39 (1988), 321-353; Showalter, Plant Cell 5 (1993), 9-23.) Extensine gehören zur Familie der hydroxyprolinreichen Glykoproteine (HRGPs). Gene und cDNAs codierend für Extensine konnten bisher charakterisiert werden aus Karotte (Chen und Varner, EMBO J. 4 (1985), 2145-2151), Bohne (Corbin et al., Mol. Cell Biol. 7 (1987), 4337-4344), Raps (Evans et al., Mol. Gen. Genet. 223 (1990), 273-287), Tomate (Showalter et al., Plant Mol. Biol. 16 (1991), 547-565) und Tabak (Memelink et al., EMBO J. 6 (1987), 3579-3583).

Die Genexpression der Extensine ist entwicklungsabhängig und eher gewebespezifisch als konstitutiv reguliert (Sommer-Knudsen et al., Phytochemistry 47 (1998), 483-497; Ye et al., Plant Cell 3 (1991), 23-37). Vergleicht man die Gewebespezifität verschiedener Extensingene unterschiedlicher Pflanzen, so stellt man fest, daß das Expressionsmuster von Extensingenen in Abhängigkeit von der Art der untersuchten Pflanze, vom Zelltyp und vom Gewebetyp deutlich variieren kann (Showalter et al., Plant Mol. Biol. 19 (1992), 205-215).

In Sojabohne werden HRGPs am stärksten in meristematischen Zellen exprimiert. Das HRGPnt3-Gen aus Tabak wird im Perizyklus und in der Endodermis, speziell in bestimmten Zellen, welche an der Bildung von Seitenwurzeln beteiligt sind, exprimiert (Keller et al., Proc. Nat. Acad. Sci 86 (1989), 1529).

Es wurde beschrieben, daß die Genexpression der Extensine durch Umweltfaktoren reguliert werden kann, wie z.B. Licht, Pathogenbefall, Verwundung, Hitzestress (siehe beispielsweise Cassab und Varner, Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39 (1988), 321-353; Cortin et al., Mol. Cell Biol. 7 (1987), 4337-4344; Niebel et al., Plant Cell 5 (1993), 1697-1710). Dies ist jedoch nicht für alle Extensine der Fall (Sommer-Knudsen et al., Phytochemistry 47 (1998), 483-497).

Das mature Extensinprotein ist normalerweise reich an Hydroxyprolin (Hyp), Serin und an bestimmten Kombinationen der Aminosäuren Valin, Tyrosin, Lysin und Histidin.

Die Primärstruktur von Extensinen (für einen Überblick siehe beispielsweise Sommer-Knudsen, Phytochemistry 47 (1998), 483-497) ist in der Regel charakterisiert durch mindestens eine Ser-Pro_{3,6}-Peptideinheit, die auch wiederholt oder in Verbindung mit ähnlichen Sequenzen, wie z.B. folgenden Sequenzmotiven SOOOO, SPPPKH, SPPPKK, SPPPKKPYYPP, SPPPSp, SPPPSPKYVYK, SPPPSpSPPP, SPPPYYYH, SPPPYYYK, SOOOOTOVYK, SPPPPTPVYK, SOOOOVYK, SPPPPTYK, SPPPVYSPPPP, SPPPVHSPPPVA, SPPPVK, SPPPVKSPPP, SOOOOVKP auftreten kann (s. auch Sommer-Knudsen et al., a.a.O.).

Extensine unterliegen einer starken post-translationalen Modifikation. Beim Karotten-Extensin beispielsweise werden die meisten der Prolin-Reste durch Prolyl-Hydroxylasen hydroxyliert. Die Hydroxyprolinreste dienen als Angiffsstelle für Glykosylierungen (Lamport et al., Biochem J. 133 (1972), 125-132; van Holst, Plant Physiol. 74 (1984), 247-251). Die Kohlenhydrate, vornehmlich Galactose und Arabinose (Smith et al., Phytochemistry 25 (1986), 1021ff; Holst et al., Plant Physiol. 74 (1984), 247; Smith et al., Phytochemistry 23 (1984), 1233) dienen der Stabilisierung der Proteine (Showalter, Plant Cell 5 (1993), 9-23). Die Arabinose tritt hauptsächlich in der Hyp-Ara₁₋₄-, die Galaktose in der Ser-Gal-Form auf.

Darüberhinaus wurde eine Verknüpfung verschiedener Extensine über Isodityrosin-bindungen diskutiert, was beispielsweise als Antwort auf Pathogenbefall zu einer weiteren Verstärkung der Zellwand führen kann (Brisson, Plant Cell 6 (1994), 1703-1712; Epstein,

Phytochemistry 23 (1984), 1241-1246). Intramolekulare Isodityrosinbindungen konnten in Extensinen nachgewiesen werden (Epstein et al., Phytochemistry, 23 (1984), 1241 ff.). Intermolekulare Isodityrosinbindungen konnten hingegen bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden (Everdeen et al., Plant Physiol. 87 (1988), 616ff.; Huystee et al., Plant Phys. Biochem. 33 (1995), 55ff.).

Mit Hilfe des Prolin-Analogs 3,4-Dehydro-L-Prolin (Dhp) läßt sich die Prolyl-Hydroxylase selektiv inhibieren, so daß man die Biosynthese des Hydroxyprolins mit Hilfe von Dhp reduzieren kann. Für Wurzelscheiben der Möhre (*Daucus carota*) konnte nach Behandlung mit Dhp gezeigt werden, daß sie strukturell veränderte HRGPs synthetisieren. Auch die Behandlung von Tabakprotoplasten mit Dhp führte zur Regeneration von Zellwänden mit veränderter Struktur (Cooper, Plant Physiol. 104 (1994), 747-752).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Expressionskassetten enthaltend einen erfindungsgemäßen Promotor. Unter dem Begriff "Expressionskassette" wird dabei die Kombination eines erfindungsgemäßen Promoters mit einer zu exprimierenden Nucleinsäuresequenz verstanden. Diese Nucleinsäuresequenz kann beispielsweise eine ein Polypeptid codierende Sequenz sein, d.h. ein Strukturgen. Sie kann in sense- oder in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft sein. Die Nucleinsäuresequenz kann auch eine nicht-translatierbare RNA, beispielsweise eine antisense-RNA oder ein Ribozym, codieren. Diese Nucleinsäuresequenzen können in Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Promotor benutzt werden, um Pflanzen mit verändertem, vorzugsweise verbessertem Phänotyp herzustellen. Weiterhin kann der Stoffwechsel der Pflanze in der Wurzel mittels des erfindungsgemäßen Promoters beeinflußt werden. Einige Beispiele zur heterologen (Über)expression und zur Antisense-Inhibierung mit dem Ziel, Stoffwechselflüsse in transgenen Pflanzen zu manipulieren, sind in Herbers und Sonnewald (TIBTECH 14 (1996), 198-205) zusammengefaßt. Ein Beispiel für Ribozyme wurde von Feyter (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-228) publiziert. Vielfältige Anwendungsmöglichkeiten von transgenen Pflanzen, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Promotoren und Vektoren erzeugt werden können, sind auch in TIPTEC Plant Product & Crop Biotechnology 13 (1995), 312-397 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weiterhin eine Transkriptionsterminationssequenz stromabwärts des 3'-Endes der mit dem Promotor verknüpften Nucleinsäuresequenz enthalten. Unter einer "Transkriptionsterminationssequenz" wird dabei eine DNA-Sequenz verstanden, die am 3'-Ende eines codierenden Genabschnitts lokalisiert ist und in der Lage ist, die Beendigung der Transkription und gegebenenfalls die Synthese eines Poly-A-Schwanzes hervorzurufen. Ein Beispiel für eine solche Terminationssequenz ist die des Octopinsynthasegens.

Erfindungsgemäß können zwischen dem Promotor und der Nucleinsäuresequenz bzw. zwischen der Nucleinsäuresequenz und dem Terminator jeweils eine oder mehrere Restriktionsschnittstellen liegen.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die mindestens einen erfindungsgemäßen Promotor enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Promotor in einem derartigen Vektor verknüpft mit einem Polylinker, der eine Integration beliebiger Sequenzen stromabwärts des Promotors erlaubt. Dabei wird unter einem "Polylinker" eine DNA-Sequenz verstanden, die Erkennungssequenzen von mindestens einem Restriktionsenzym, vorzugsweise von zwei oder mehr Restriktionsenzymen, enthält.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßer Vektor auch noch eine Sequenz für die Termination der Transkription, beispielsweise die des Octopinsynthasegens, stromabwärts des Promotors bzw. des Polylinkers.

Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die erfindungsgemäße Expressionskassetten enthalten. Vorteilhaftweise enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren Selektionsmarker, die geeignet sind, Zellen, die die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten, zu identifizieren und gegebenenfalls zu selektionieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Vektoren geeignet zur Transformation von pflanzlichen Zellen und besonders bevorzugt zur Integration von Fremd-DNA in das pflanzliche Genom. Ein Beispiel für derartige Vektoren sind binäre Vektoren, die zum Teil auch bereits kommerziell erhältlich sind.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Promotor oder mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder Vektor genetisch modifiziert sind.

"Genetisch modifiziert" bedeutet dabei, daß die Wirtszelle einen erfindungsgemäßen Promotor oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette oder Vektor enthält, vorzugsweise stabil ins Genom integriert, und der Promotor bzw. die Expressionskassette entweder in die Wirtszelle oder in einen Vorgänger dieser Zelle als Fremd-DNA eingebracht wurde. D.h. die erfindungsgemäßen Zellen können entweder selbst das unmittelbare Produkt eines Transformationseignisses sein oder davon abstammende Zellen, die einen erfindungsgemäßen Promotor oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Als Wirtszellen kommen sowohl prokaryontische, insbesondere bakterielle, als auch eukaryontische Zellen in Frage. Eukaryontische Zellen können beispielsweise Pilzzellen sein, insbesondere der Gattung *Saccharomyces*, bevorzugt von der Art *Saccharomyces cerevisiae*.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen Vektoren, erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder erfindungsgemäßen Wirtszellen zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen, die im folgenden als transgene Pflanzenzellen bezeichnet werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Diese können jeder beliebigen Pflanzenart, -gattung, -familie, -ordnung bzw. -klasse angehören. Es können sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen sein. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Pflanzen Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die für den Menschen von agrarwirtschaftlichem, forstwirtschaftlichem und/oder gartenbauwirtschaftlichem Interesse sind. Bevorzugt sind dabei landwirtschaftliche Nutzpflanzen, wie z.B. Getreidearten (z.B. Weizen, Hafer, Gerste, Roggen), Mais, Reis, Kartoffeln, Rüben, Tabak, Zuckerrohr, Zuckerrübe, Sonnenblume, Banane, Raps oder Futter-

und Weidegräser (wie z.B. Alfalfa, weißer Klee, roter Klee), Flachs, Baumwolle, Soja, Hirse, Bohne, Erbse etc, Gemüsepflanzen (wie z.B. Tomate, Gurke, Zucchini, Aubergine, Kohlarten, Artischocke, Chicoree etc), Obstbaumgewächse, Hopfen, Wein usw. Von Interesse sind auch Kräuter und Heilpflanzen, wie z.B. *Catharanthus roseus*, *Datura stramonium*, *Taxus* SSP.I, *Dioscorea deltoidea*, *Papaver somniferum*, *Atropa belladonna*, *Rauwolfia serpentina*, *Hyoscyamus niger*, *Digitalis lanata*, *Datura metel*, *Digitalis purpurea*, *Pilocarpus jaborandi*, *Cinchona ledgeriana*, *Aconitum napellus*.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder mit einem erfindungsgemäßen Mikroorganismus transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen Vektoren, erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder erfindungsgemäßen Wirtszellen zur Herstellung transgener hairy roots durch *Agrobacterium rhizogenes*.

Die erfindungsgemäßen Pflanzen können nach dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden, z.B. durch Transformation pflanzlicher Zellen oder Gewebe und Regeneration ganzer Pflanzen aus den transformierten Zellen bzw. dem Gewebe.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Verfahren zur Transformation von Pflanzenzellen und Pflanzen, vorzugsweise dikotylen Pflanzen, vorzugsweise unter Verwendung der Agrobakterium-vermittelten Transformation,

sind intensiv untersucht und ausreichend in EP 0 120 516; Hoekema (In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), Kapitel V); Fraley et al. (Crit. Rev. Plant Sci. 4 (1993), 1-46) und An et al. (EMBO J. 4 (1985), 277-287) beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel siehe z.B. Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 29-33).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobakterium-basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2 (1993), 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen oder die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (z.B. WO 95/06128, EP 0 513 849, EP 0 465 875, EP 0 292 435; Fromm et al., Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80 (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschreiben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296 (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobakterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei et al., Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park et al., J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam et al., Plant Cell Rep. 13 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao et al., Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203) sowie die

Elektroporation (Xu et al., In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Vermehrungs- und Erntematerial von erfindungsgemäßen Pflanzen, das erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthält. Der Begriff "Vermehrungsmaterial" umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome, Wurzelstöcke oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasmata, Zellkulturen etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und Samen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Promotoren, die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Hybridisierung einer pflanzlichen genomischen Bank mit einer cDNA, die für ein extensinähnliches Protein codiert;
- b) Isolierung positiver Klone;
- c) Testung der isolierten Klone auf Promotoraktivität.

Die in Schritt a) durchgeführte Hybridisierung erfolgt vorzugsweise unter stringenten Bedingungen. Hierbei werden bekannte Sequenzen, die ein extensinähnliches Protein codieren, oder Teile davon zur Hybridisierung mit einer entsprechenden Bibliothek, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen eingesetzt. Bevorzugt wird die unter SEQ ID No. 7 aufgeführte Sequenz oder Teile davon eingesetzt. Die Methoden sind dem Fachmann bekannt und sind detailliert beschrieben, z.B. in Sambrook et al. (a.a.O.).

Wie bereits vorstehend erwähnt, versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung unter einem extensinähnlichen Protein ein Protein, dessen Aminosäuresequenz mindestens eines der Sequenzmotive SPPPPP, SPPPPYYY, SPPPPY, SPPPPVY, PPPPPYY, PPPPPSY, PPPPPTY, PPPPPAY, PPPPPEY, PPPPPXY, SOOOO, SPPPPKH, SPPPPKK, SPPPPKKPYYP, SPPPPSP, SPPPPSPKYVYK, SPPPPSPSPPPP, SPPPPYYYH,

SPPPPYYYK, SOOOOTOVYK, SPPPPTPVYK, SOOOOVYK, SPPPPTYK, SPPPPVYSPPP, SPPPVHSPPPVA, SPPPPVYK, SPPPVKSPPP, SOOOOVKP aufweist und das eine Homologie von mindestens 60%, vorzugsweise von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere von mindestens 95% zu der unter SEQ ID No. 7 angegebenen codierenden Region aufweist. Die unter Schritt b) genannte Identifizierung positiver Klone und Isolierung der Promotorsequenz erfolgt nach Methoden, die dem Fachmann bekannt sind und die beispielsweise beschrieben sind bei Sambrook et al. (a.a.O.).

Die Expressionseigenschaften des isolierten Promotors können durch Reportergen-Experimente analysiert werden. Zur unter Schritt c) genannten Testung der isolierten Promotorsequenzen auf Promotoraktivität in Wurzelzellen kann der Promotor beispielsweise in einer Expressionskassette bzw. in einen Vektor zur Pflanzentransformation operativ mit einem Reportergen, wie z.B. dem β -Glucuronidasegen aus *E. coli*, verknüpft werden. Dieses Konstrukt wird zur Transformation von Pflanzen verwendet. Anschließend wird die organspezifische Expression der β -Glucuronidase bestimmt, wie z.B. bei Martin et al. (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) beschrieben. Diejenigen Promotoren, die eine Wurzelspezifität aufweisen, werden selektioniert und anschließend isoliert.

Unter einer operativen Verknüpfung versteht man in diesem Zusammenhang die sequentielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiteren regulativen Elementen, wobei jedes der genannten Elemente seine Funktion bei der Genexpression bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren oder der mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Promotoren zur wurzelspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

Der Begriff "Transgen" bedeutet dabei eine in eine Pflanze künstlich eingeführte DNA-Sequenz.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann offenbart und offensichtlich und umfaßt durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung. Weiterführende Literatur kann zu einer der oben angeführten Methoden, Mittel und Verwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, dem Stand der Technik entnommen werden, z. B. aus öffentlichen Bibliotheken unter z. B. der Benutzung von elektronischen Hilfsmitteln. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an wie die "Medline", die über Internet zur Verfügung stehen, z. B. unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z. B. unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Northern Blot Analyse von RNA aus Wurzeln

5 µg Gesamt-RNA von abgestreiften Wurzeln und Wurzelhaaren und 10 µg Gesamt-RNA der angegebenen Tomatenorgane wurden für die "Northern blot" Analyse pro Spur aufgetragen. Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierter *LeExt1* cDNA oder 25S rDNA cDNA. Die Transkriptgrößen sind zur rechten Seite angegeben. 25S rDNA diente als Kontrolle für gleichmässiges Beladen der Spuren und Transfer auf die Nylon Membran. Abgestreifte Wurzeln sind Wurzeln nach Wurzelhaarisolierung mit einer deutlich reduzierten Anzahl an Wurzelhaaren. Die Isolierung pflanzlicher RNA erfolgte nach der heißen Phenol Extraktion- Methode von Verwoerd et al. (Nucleic Acids Research 17 (1989), 2362). Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit UV- Bestrahlung daran fixiert. Nach Hybridisierung und Waschen wurde die radioaktive Membran auf Röntgenfilm exponiert. Dieser wurde nach einer über-Nacht-Exposition bei -80°C entwickelt. Die Intensität der Signale korreliert mit der Konzentration der spezifischen mRNA auf der Membran.

Figur 2: Northern Blot Analyse zur Expression von *LeExt1*

10 µg Gesamt- RNA (5 µg im Falle der Spuren 3 und 4: 18 Tage und Erde) von 7, 14 und 18 Tage alten Keimlingen (7 Tage, 14 Tage, 18 Tage), auf Erde gewachsenen Wurzeln (Erde), Keimlingswurzeln, welche im Dunkeln (-Licht) oder im Licht (+Licht) inkubiert wurden, und Kontrollen (Kontrolle), sowie verwundete Blätter (Verwundung) wurden für die RNA "Northern blot" Analyse verwendet. Radioaktiv markierte *LeExt1* cDNA wurde für die Hybridisierung verwendet. Die Isolierung pflanzlicher RNA erfolgte nach Verwoerd et al. (1989) (s.o.). Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit UV-Bestrahlung daran fixiert. Nach Hybridisierung und Waschen wurde die radioaktive Membran auf Röntgenfilm exponiert. Dieser wurde nach einer über-Nacht-Exposition bei -80°C entwickelt. Die Intensität der Signale korreliert mit der Konzentration der spezifischen mRNA auf der Membran.

Figur 3: *In situ*-Nachweis der *LeExt1* mRNA

Lokalisation des *LeExt1* Transkripts in Tomatenwurzeln. Lichtmikroskopische Aufnahmen von jungen Tomatenwurzeln unter sterilen Bedingungen. **A**, **B** In Paraffin eingebettete Schnitte wurden entsprechend der *in situ*-Hybridisierungsmethode wie in Daram et al. (Planta 206 (1998), 225-233) beschrieben mit nicht-radioaktiv markierter *LeExt1* "antisense" RNA hybridisiert. **A** Junge Keimlingswurzel mit wachsenden Wurzelhaaren in der Differenzierungszone der Wurzel. **B** Wurzelhaarzone einer jungen Keimlingswurzel. Die Wurzelspitze ist auf der linken Seite lokalisiert. Die Größe des Balkens beträgt 200 µm.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Isolierung eines wurzelspezifischen GensPflanzenmaterial und Wurzelhaargewinnung

Als Pflanzenmaterial dienten verschiedene Organe von auf Erde im Gewächshaus gewachsenen Tomatenpflanzen *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker. Für die Wurzel- und Wurzelhaargewinnung wurden 8000 oberflächensterilierte Samen auf ein Metallgitter auf Papier (No. 0858, Schleicher & Schuell, Deutschland) unter sterilen Bedingungen in Petrischalen ausplattiert. Das Papier wurde vorgängig in 0.5x Hoagland Lösung angefeuchtet. Keimung geschah bei 22°C bei einem Tag/Nacht Zyklus von 16h/8h. Am Tage 3 nach der Keimung wurde das Netz um ca. 4mm über das Papier angehoben, indem sterile Glaskugeln zwischen Netz und Papier geschoben wurden. Dies erlaubte vertikales Wachstum der Keimplingswurzeln und optimale Wurzelhaarbildung. Am Tage 5 wurden die Keimplinge mitsamt dem Netz in flüssigen Stickstoff getaucht und die Wurzeln wurden mit einem Spatel vom Netz weggekratzt. Die Wurzelhaare wurden daraufhin wie in Röhm und Werner (Physiologia Plantarum 69 (1987), 129-136) beschrieben in flüssigem Stickstoff von den Wurzeln abgestreift und durch Filter über ein 250 µm Analysensieb gereinigt.

Für die "Northern blot" Analyse von Keimplingswurzeln unterschiedlichen Alters wurden die Keimplinge wie oben beschrieben während 7, 14 und 18 Tagen inkubiert und die Wurzeln entsprechend isoliert. Zur Isolierung von behaarten Wurzeln von auf Erde gewachsenen Pflanzen wurden dicht durchwachsene Pflanzentöpfe aus dem Gewächshaus vom Erdballen entfernt. Die an der seitlichen Oberfläche des Erdballens wachsenden Wurzeln wurden mit der Pinzette abgeerntet und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für Licht/Dunkel Versuche wurden Keimplinge wie oben beschrieben inkubiert in einem Tag/Nachtzyklus von 16h/8h Belichtung. 7 Tage alte Wurzeln wurden nach 4-stündiger Belichtung nach Beginn des Tagzyklus geerntet. Parallel dazu wurden Keimplinge während 7 Tagen im Dauerdunkeln inkubiert und danach deren Wurzeln ebenfalls geerntet. Tomatenblätter wurden wie in Peña-Cortés et al. (Planta 186 (1992), 495-502) beschrieben verwundet und nach 24 h geerntet. Als Kontrolle wurden unverwundete Blätter verwendet.

RNA Extraktion und Herstellung einer cDNA Bibliothek

Gesamt-RNA aus den angegebenen Organen wurde nach der Methode von Verwoerd et al. (Nucleic Acid Research 17 (1989), 2362) extrahiert. 7-60 µg totale RNA aus Wurzelhaaren wurde für die Isolierung der poly(A)⁺ RNA mittels dem Gebrauch von magnetischen oligodT Kugelchen (Dynabeads, Dynal, Deutschland) weiterverwendet. 700 ng poly(A)⁺ RNA wurden für die Herstellung doppelsträngiger cDNA verwendet (Pharmacia, Deutschland). Die cDNA wurde nach Anhängen eines *Eco*RI/*Not*I linkers in den Expressionsvektor λ ZAPII (Stratagene, Deutschland) kloniert. Verpackung in den λ Phagen erfolgte mit dem Gigapack II Gold Packaging Extract Kit von Stratagene (Deutschland).

Differentielles Durchmustern der Wurzelhaar-spezifischen cDNA Bibliothek

500,000 in Phagen verpackte cDNAs wurden auf YT Agar in Agarschalen ausplattiert und nach einem Standardprotokoll (Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Press., Cold Spring Harbour, NY.) mit 680 ng radioaktiv markierter revers transkribierter mRNA aus entweder Wurzelhaaren oder abgestreiften Wurzeln durchmustert. 100 putativ positive Plaques wurden einer zweiten Durchmusterung unterworfen, um Artefakte zu vermeiden. Letzlich wurden 76 positive Plaques für die *in vivo*-Excision weiterverwendet. Die daraus folgenden Bakterienkulturen wurden in einer 96er Mikrotiter Platte in 2x YT Medium (Sambrook et al., s.o.) bei 28°C über Nacht geschüttelt. Plasmid-DNA aus diesen Kulturen wurden für eine zweite Durchmusterung verwendet, indem eine Art reverser Southern-Methode, wie in Bucher et al. (Plant Molecular Biology 35 (1997), 497-508) beschrieben, angewendet wurde. Nach *Eco*RI Verdau von vielversprechenden Plasmiden wurde die entsprechenden Inserts isoliert und für die "Northern blot" Analyse weiterverwendet.

"Northern blot" Analyse und DNA Sequenzierung

5-10 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Organen wurden nach Glyoxylierung auf ein 1,2-prozentiges Agarose-Glyoxalgel geladen (Hull (1985), Purification, biophysical and biochemical characterisation of viruses with special reference to plant viruses. In: Mahy, (ed.), Virology. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK, pp. 1-24). "Northern blot" Analyse und Hybridisierungsbedingungen wurden Standardvorschriften entnommen (Sambrook et al., s.o.). Die Blots wurden bei 68°C hybridisiert. Detektion von *LeExt1*

mRNA wurde erreicht durch Verwendung der *LeExt1* cDNA als radioaktive Sonde. Die letzte Waschung des Blots erfolgte mit 0.1 x SSC bei 68°C. Nach dem Waschen wurden die Blots auf Röntgenfilm (Kodak, Deutschland) exponiert bei -80°C. Die Transkriptgrößen wurden durch Vergleich mit glyoxylierter Marker DNA (BRL, Deutschland) bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Figuren 1 und 2 dargestellt.

Sequenzierung der *LeExt1* cDNA (= SEQ ID. No. 7) erfolgte durch Verwendung der Didesoxysequenzierung mit T7 DNA Polymerase (Amersham, Deutschland). Sequenzanalyse erfolgte mit dem University of Wisconsin GCG Packet (Devereux et al., A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Research 12 (1984), 387-395).

**Beispiel 2: Isolierung eines genomischen Fragments, das die Promotorregion des
wurzelspezifischen Gens umfaßt**

Eine genomische DNA Bibliothek aus Tomate (Clontech Laboratories, USA) wurde mit radioaktiv markierter *LeExt1* cDNA (s. Beispiel 1) durchmustert. 500,000 Plaque formende Einheiten (PFE) der DNA Bibliothek wurden dazu auf YT Agar in Agarschalen ausplattiert, über 6 bis 8 Stunden bei 37°C inkubiert und auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham, Deutschland) transferiert (Sambrook et al., s.o.). Hybridisierungsbedingungen wurden Standardvorschriften entnommen (Sambrook et al., s.o.). 30 Plaques von der ersten Durchmusterung wurden für eine zweite Runde ausgewählt. Die Phagensuspensionen von zwei ausgewählten Plaques nach der zweiten Durchmusterung wurden erneut ausplattiert, um Phagenlysate herzustellen. Davon wurde λ DNA nach Lockett (Analytical Biochemistry 185, (1990), 230-234) präpariert. Je 600 ng λ DNA wurden daraufhin mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und die daraus resultierenden Fragmente auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Nach Southern Blot-Hybridisierung (Sambrook et al., s.o.) mit radioaktiv markierter *LeExt1* cDNA wurde letztlich ein ungefähr 3.4 kb langes genomisches Fragment isoliert, welches mit *LeExt1* cDNA hybridisiert hat und in ebenfalls mit *Asp718* verdautes pBluescript II SK⁻ Plasmid kloniert. Das Fragment wurde durch Didesoxysequenzierung mit T7 DNA Polymerase (Amersham, Deutschland) zunächst partiell sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß das genomische Fragment über 204

Basenpaare mit der *LeExt1* cDNA Sequenz überlappte und sich 5' aufwärts in den nichtcodierenden Bereich des *LeExt1* Gens weitererstreckt.

Anschließend wurden beide Stränge des genomischen Fragments (ca. 3.4 kb) sequenziert (SEQ ID No. 13).

Beispiel 3: Herstellung von GUS-Expressionskassetten zur Analyse der Funktionalität des Promotors

Es wurden insgesamt drei verschiedenartige GUS-Expressionskassetten hergestellt.

A. Translationelle Fusion des 3.4 kb großen genomischen Fragments enthaltend ungefähr 200 Basenpaare codierende Sequenz der *LeExt1* cDNA mit einer GUS Kassette. Das genomische Fragment wurde durch einen *Kpn*I Verdau aus dem pBluescript II SK⁻ Plasmid herausgeschnitten, mittels einer Auffüllreaktion mit der T7 DNA Polymerase geglättet (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York., 1998) und in den mit *Sma*I verdauten und dephosphorylierten binären Vektor pBI101.3 kloniert (Clontech, USA). pBI101.3 ist ein Plasmid, das eine promotorlose GUS Kassette im binären Vektor pBIN19 enthält. Dieses Konstrukt wurde roh1 genannt.

B. Transkriptionelle Fusion eines modifizierten genomischen Fragmentes mit einer GUS Kassette. Mit den Oligonucleotiden 42trx3 (5'-GAGAGTCGACGATATCGGGCGAATTGGGTACC-3', SEQ ID No. 9), enthaltend die Restriktionsschnittstelle von *Sa*II, und 42trx4 (5'-GAGATCTAGAGGTACCGGACTTATATAACATAAC-3', SEQ ID No. 10), enthaltend die Restriktionsschnittstelle von *Xba*I, wurde mittels PCR (30 sec bei 94°C Schmelzen der DNA, 1 min bei 60°C Anlagerung der Primer, 1 min bei 72°C mit 3 sec Extension pro Zyklus DNA Synthese mittels Taq DNA Polymerase [Fermentas, Litauen]) ein genomicsches Fragment von ca. 3200 bp Länge synthetisiert, welchem der, mit der *LeExt1* cDNA überlappende, ORF (open reading frame) fehlt. Das Fragment wurde mit *Sa*II und *Xba*I verdaut und in das ebenso verdaute und dephosphorylierte pBluescript II SK⁻ Plasmid kloniert. Nach Isolation des Plasmids aus einer *E.coli* DH5 α Kultur (Sambrook et al., s.o.).

wurde das Fragment mittels *SaII/XbaI* Verdau isoliert und durch eine Auffüllreaktion mittels T7 DNA Polymerase geglättet. Das Endprodukt wurde daraufhin in den mit *SmaI* verdauten und dephosphorylierten binären Vektor pBI101.3 kloniert. Dieses Konstrukt wurde rohtrx genannt.

C. Es wurde ein PCR Produkt von ca. 3270 bp mit Hilfe folgender Primer hergestellt: 42Xba (5'-GAGATCTAGACCATGGAGAAGAATTGG-3', SEQ ID No. 11) und 42Sal (5'-GAGAGTCGACGGCGAATTGGGTACCG-3', SEQ ID No. 12). Die PCR Bedingungen waren: 20 sec bei 94°C Schmelzen der DNA, 45 sec bei 50°C Anlagerung der Primer, 2 min bei 72°C DNA Synthese mittels Pfu DNA Polymerase (Stratagene, Deutschland). Das PCR-Produkt wurde nach der Anleitung des Herstellers direkt in das Plasmid pCR-Script kloniert (Stratagene, Deutschland). Nach *SaII/NotI* Verdau wurde das PCR Produkt mit dem Klenow Enzym geglättet [Sambrook, 1989 #68] und in *SmaI* verdautes und dephosphoryliertes pBluescript II SK⁺ Plasmid kloniert. Nach Plasmidpreparation (Sambrook et al., s.o.). wurde das Plasmid mit *BstXI* verdaut und linearisiert. Durch serielle Verkürzung des PCR-Produktes mittels Exonuclease III und S1 Nuclease vom 5' Ende her gemäß dem Protokoll des Herstellers (Fermentas, Litauen) wurden verkürzte genomische Fragmente folgender ungefährer Länge hergestellt: 2.2 kb, 1.7 kb, 1.4 kb, 1.1 kb, 0.9 kb und 0.55 kb. Die *AKT1*-GUS-3'NOS Kassette aus dem Plasmid 5'*AKT1*-320.X (Lagarde et al., Plant J. 9 (1996), 195-203) wurde mit *SacI* isoliert, mittels Mung Bean Nuclease Behandlung geglättet (New England BioLabs Inc., Bioconcept, Switzerland) und mit *NcoI* nachverdaut. Die so erhaltene GUS-3'NOS Kassette wurde in *NcoI/EcoRV* verdaute und dephosphorylierte pBluescript II SK⁺ Plasmide enthaltend die verkürzten genomischen Fragmente kloniert. Die so hergestellten Promotor-GUS-3'NOS Kassetten wurden durch Verdau mit *SacI* und *SaII* aus dem jeweiligen Plasmid isoliert und in *SacI/SaII* verdauten und dephosphorylierten binären Vektor Bin19 (Bevan et al., Nucleic Acids Research 12 (1984), 8711) kloniert. Die erhaltenen Konstrukte wurden im folgenden BIN- Δ genx-GUS genannt, wobei x die jeweilige Fragmentlänge 2.2 kb (SEQ ID No. 1), 1.7 kb (SEQ ID No. 2), 1.4 kb (SEQ ID No. 3), 1.1 kb (SEQ ID No. 4), 0.9 kb (SEQ ID No. 5) oder 0.55 kb (SEQ ID No. 6) bezeichnet.

Beispiel 4: Pflanzentransformation

Die beschriebenen Konstrukte enthaltend die verschieden großen Promotorfragmente wurden durch Elektroporation in den Agrobakteriumstamm C58C1 enthaltend das Plasmid pGV2260 (Deblaere et al., Nucleic Acids Research 13 (1985), 4777-4788) eingeführt. Die Agrobakterien wurden auf YEB Medium (Vervliet et al., Journal of General Virology 26 (1975), 33-48) kultiviert. Die Transformation von Tabak und Tomatenpflanzen erfolgte nach der Methode des durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfers, wie von Rosahl et al. (EMBO J. 6 (1987), 1155-1159) für Tabak und von Lillatti et al. (Biotechnology 5 (1987), 726-730) für Tomate beschrieben, durchgeführt.

Darüberhinaus erfolgte die Transformation von Kartoffel wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 23-29).

Die Transformation von Mais erfolgte wie bei Omirulleh et al. (in "Gene Transfer to Plants", Potrykus, Spangenberg (Eds), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, S. 99 ff.) beschrieben.

Die oben beschriebenen Konstrukte wurden darüberhinaus durch Elektroporation in den *A. rhizogenes* Stamm 15834 (Jung et al., Biotechnol Lett 14 (1992), 695-700) eingeführt und anschließend zur Transformation von *Catharanthus roseus* mittels *Agrobacterium rhizogenes* in Anlehnung an Toivonen et al. (Plant Cell Tissue Org. Cult. 18 (1988), 79 ff.) verwendet.

In den hairy roots konnte eine starke GUS-Expression nachgewiesen werden. Die Transformation von Reis erfolgte mittels der particle bombardement-Methode, wie beispielsweise beschrieben bei Christou (Plant Mol. Biol. 35 (1997), 197-203).

Beispiel 5: Histochemische Lokalisierung der *LeExt1* Promotoraktivität

Das Pflanzenmaterial wurde mit einer 0.1%igen X-Gluc Lösung (0.1 g X-Gluc in 1 ml Dimethylformamid vorlösen, 1 ml 10% Triton und 5 ml 1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 dazugeben und mit Destwasser auf 100 ml auffüllen) vakuumfiltriert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Färben wurden die Pflanzen in Ethanol:Essigsäure (3:1) fixiert

und in 100% Ethanol entfärbt. Dabei wurden grüne Pflanzenteile farblos, währenddem der blaue Farbstoff stabil bleibt; siehe Figur 3.

Beispiel 6: Untersuchung der Spezifität und der Stärke des Promotors

Zur Untersuchung der Spezifität des Promotors wurde an Kartoffel- und an Tomatenpflanzen die GUS-Aktivität in Blättern im Vergleich zur Aktivität in Wurzeln nach der von Jefferson et al. (EMBO J. 6 (1987), 3901-3907) beschriebenen Methode bestimmt.

In Tomate ist die GUS-Aktivität in Wurzeln zwischen 20 und 300 mal höher als in maturen Blättern. Die meisten der untersuchten GUS-positiven Kartoffelpflanzen zeigten eine starke GUS-Aktivität in den Wurzeln, aber keinerlei GUS-Aktivität in maturen Blättern.

Zur Bestimmung der Stärke des Promotors wurden die GUS-Aktivitäten verglichen mit solchen des 35S-Promotors. Die Linien mit der stärksten Aktivität des Promotors wiesen im Vergleich zum CaMV 35S-Promotor eine etwa halb so starke Aktivität auf.

Patentansprüche:

1. Promotor, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Promotoren, die die unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebene Nucleinsäuresequenz umfassen;
 - b) Promotoren, die einen funktionalen Teil der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 angegebenen Nucleinsäuresequenz umfassen und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken;
 - c) Promotoren, die eine Sequenz aufweisen, die mit der unter Seq ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 oder SEQ ID No. 6 gezeigten hybridisiert, und die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken; und
 - d) Promotoren von Genen, die ein Protein codieren dessen Aminosäuresequenz eine Homologie von mindestens 60% zu der unter SEQ ID No. 8 angegebenen Aminosäuresequenz aufweist, wobei diese Promotoren in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.
2. Promotor nach Anspruch 1, der ein pflanzlicher Promotor ist.
3. Expressionskassetten enthaltend einen Promotor nach einem der Ansprüche 1 oder 2.
4. Vektor enthaltend einen Promotor nach einem der Ansprüche 1 oder 2 oder eine Expressionskassette nach Anspruch 3.
5. Vektor nach Anspruch 4, der zur Transformation von pflanzlichen Zellen geeignet ist.

6. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Promotor nach einem der Ansprüche 1 oder 2, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder einem Vektor nach Anspruch 4 oder 5.
7. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine Pflanzenzelle ist.
8. Hairy roots enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 7.
9. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 7.
10. Vermehrungs- oder Erntematerial von Pflanzen nach Anspruch 9, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 7.
11. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Vektor nach Anspruch 4 oder 5 oder mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und gegebenenfalls aus der Kultur Pflanzen regeneriert.
12. Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von Promotoren, die in Pflanzen eine wurzelspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Hybridisierung einer pflanzlichen genomischen Bank mit einer cDNA, die für ein extensinähnliches Protein codiert;
 - (b) Isolierung positiver Klone;
 - (c) Testung der isolierten Klone auf Promotoraktivität.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die verwendete cDNA identisch mit einem Teil der unter SEQ ID No. 7 dargestellten Nucleotidsequenz ist.

33

14. Verwendung eines Promotors nach einem der Ansprüche 1 oder 2 oder eines nach einem Verfahren nach den Ansprüchen 11 bis 13 identifizierten Promotors zur wurzelspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

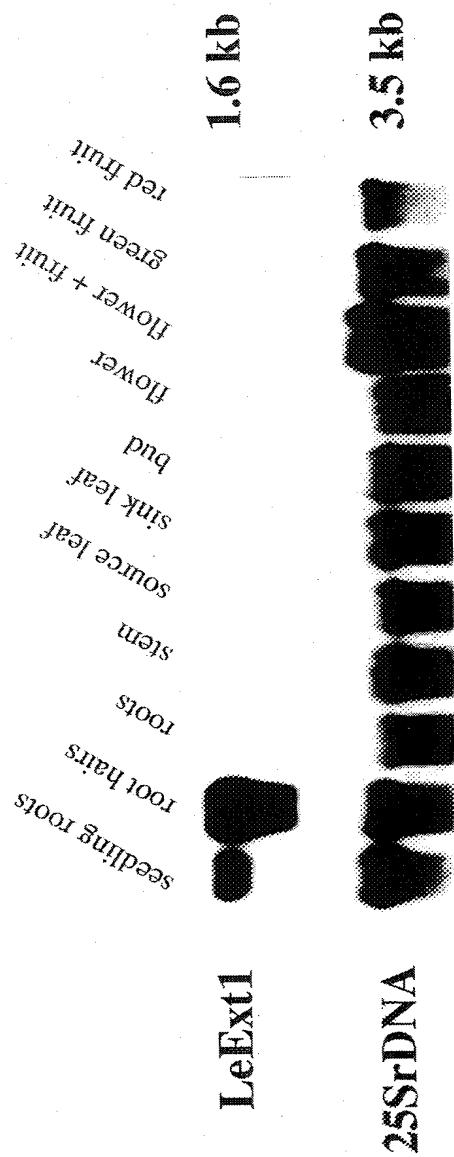


Fig.1

2/3

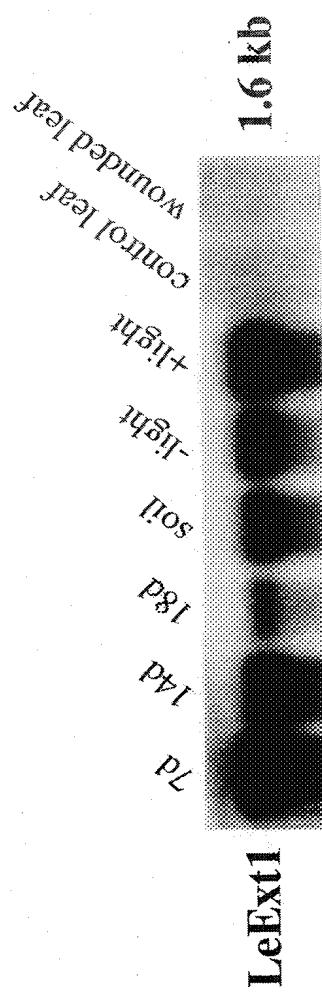


Fig.2

3/3

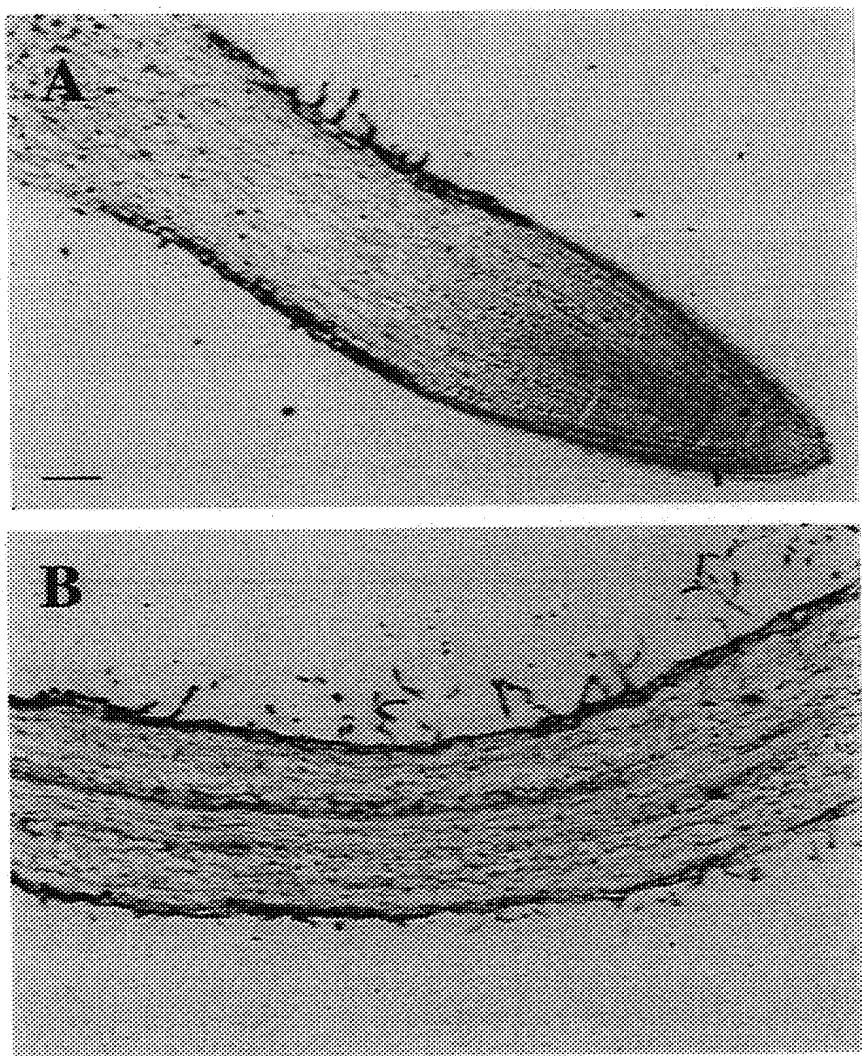


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

<110> ETH Zürich
 RIESMEIER, Jörg
 WILLMITZER, Lothar

<120> Promotoren zur Genexpression in Wurzeln von Pflanzen

<130> C 2645 PCT

<140>
 <141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 2205
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 1
 aaagtttata acacaacttc catcacatta aagacatcat ttgataacat tcgttcagc 60
 atacttatac taaagttgac gggcttcaat ataaaattaa taaggataaa ttttaagaat 120
 cacatagtt ttaactatga aattacaatc tattcgtctt tagttgtaa ttacattaaat 180
 accttaaaaaa gcaataaaaaa tcgattatat taatatgcag cttgaataca ttaaagagta 240
 tctcagatac attacaatat aaatcggta aataatatgt agctcggata cattatatta 300
 ataagtagt tatatacaat aaagaaataa gagattttag aggtttatag aaatagaagg 360
 gaatattgaa aataaggaaa agaaagggtgt gtatthaagt atttttcata attaagaata 420
 cattttcac gaaagaggtg ttcaagccaa atgaaagaag atggggccac caaaaaccca 480
 ataaaagagt ctaaaaagct gaacgcttta agtcaagagt tccttattta aaagtttct 540
 agtttaaaaaa gttttagt ttaaaaagtt tccttagtta agttttcag ctttcttagt 600
 ttaatgttc ctatgtttaaa agtttccata aaagtaggat ttaaatcgag gaaaggctca 660
 aaataatctc tcatctttag gttaaagactc aaagtgtatcc ttaagtttc acatggagca 720
 ctagtaatct atcatgtttg caatattggt acactttgg tcctaaaaaa actctaacat 780
 acttcaaaaaa tagttaacta agaataatc tattgatata ttacgaaaaaa taatcgatc 840
 aatttgcata atctgtttaa atttaaaaga agaaaaataa attgattgtt atagttataa 900
 acatatgatt cctgagagat aaaagaaaca aaaggaatcg tagtgaatca ttttaatcaa 960
 ataaaaagaa aatcgaagat aaatgttcca caaagataaa atatcagat tttttcata 1020
 agcccttcaa tattaatcat ttagtatttgc ttttaggtgtt tttgatttatttgcagaa 1080
 ttttaagctc taagtagtcaa ttttttaat atcggactt ctaaaatattt ttcagaaaat 1140
 tttcaaaaata atttgatctc ctcaattttt ttccgggtggg gttcgatatt cgggaatgaa 1200
 gtaatatctc atacaacact ttttctcaa gactagatca tacggacac aaatttgaat 1260
 tattataatt aataacccaa aatatgaaaaa tatgacatta aaaacaatag cgtctaattt 1320
 ttcccgttgg tattcattaaac taatcaaacc caaaaatattt tcattttgg tgatgaaaag 1380
 tatgtatggt actcgcagg gtacgaaaaa taatcgatc aatttgcata atctgttgc 1440
 attttaaaaga agaaaaataa attgattgtt atttttataa acatatgatt cctgagagat 1500
 aaaagaaaata aagcgaatcg tagtgaatca ttttaatcaa ataaaaacaa actcgttagat 1560
 aatatgttcca caaagataaa atattacgt tttttcata agcccttcaa tattcagtga 1620
 atcgattttct tctatcaacg tttttcagt tgatttgcata caacggagtt gctcaaagca 1680
 gcttttataat gatttgcagg taaatgcaca tgacgatcattt atcggccggc acccgaagaa 1740
 tagcttaccc atttattttt ttaaaaaaaag attaagtaca ataccatgtt gtggattgtt 1800
 agttgtgctc aacaagtaa aataattatc cgacaccaaa taatggacag tatttgcata 1860
 gcctacacat atctcaactt ttaaatattttaa attttatcaa tttttcataa ccaaaagaaa 1920
 tgaacaaaaca acattcttgc aagtcaacaa ataatcgatt caaagtttag aataggtga 1980
 gtcaagccaa tttgtatgaa tagtttatga cttccatca tctcaaaacc aaccttagt 2040
 gaacagcatt aacccaaaaa cggctgatc gtttggatca ttttaatttct aatttatcaa 2100
 atcacatgtt agttatgttataaagtc taattcctcc attctaaaac acacaagaaa 2160
 aagaaaaaca aagatataatc tagccttaga atccaaattct tctcc 2205

<210> 2
<211> 1727
<212> DNA
<213> *Lycopersicon esculentum*

<210> 3
<211> 1357
<212> DNA
<213> *Lycopersicon esculentum*

```

<400> 3
taatctgttt gaatttaaaa gaagaaaaat aaattgattg ttatagttat aaacatatga 60
ttcctgagag ataaaagaaa caaaaggaat cgtagtgaat catttaatc aaataaaaag 120
aaaatcgaag ataaatgttc cacaagata aaatatcagc attttttca taagcccttc 180
aatattaatc atttagtgat tgtttaggtg tatttgattt atattgcaga agtttaagc 240
tctaagtatg aatttttta atatcggAAC ttctaaaata ttttcagaaa attttcaaaa 300
taatttgatc tactcaattt tttccgggtg gggttcgcata ttcgggaatg aagtaatatc 360
tcatacaaca ctttttctc aagactagat catacgggac acaaatttga attattataa 420
ttaataacca aaaatatgaa aatatgacat taaaaacaat agcgtctaat tattccgtt 480
ggtatcatta actaatcaaa cccaaaatat tgcatttctt ggtgatgaaa agtatgtatg 540
gtactcgcaa gggtaacgcAA aataatcgat acaatttgcata taatctgttt gaatttaaaa 600
gaagaaaaat aaattgattt ctattgttat aaacatatga ttccgtgagag ataaaagaaa 660
taaagcgaat cgtagtgaat catttaatc aaataaaaac aaactcgttag ataaatgttc 720
cacaagata aaatattacg attttttca taagcccttc aatattcagt gaatcgattt 780
cttctatcaa cgtttttca gttgatttgcata cacaacggag ttgcgtcaaag cagctttat 840
atgatttgca agtaaatgca catgagcaat ttatcggcgg gcacccgaaag aatagcttac 900

```

ccatttattt ttttaaaaaa agattaagta caataccatg atgtggattg taagttgtgc 960
 tcaacaagta caaataatta atcgacacca aataatggac agtatttgtt aagcctacac 1020
 atatctcaac tttaaatat taattttac aattttcac aaccaaaaga aatgaacaaa 1080
 caacattctt gcaagtcaac aaataatcg ttcaaagttt agaaataggt gagtcaagca 1140
 aatgtgtatg aatagttt gacttccat tatctcaaaa ccaaccttag tggAACAGCA 1200
 ttaaccaaaa aacgctgtat atgtttggat tatttaattt ctaattttatc aaatcacatg 1260
 ttagttatgt tatataaagt cctaattcct ccattctaaa acacacaaga aaaagaaaaaa 1320
 caaagatata tctagcctt gaatccaatt ctctcc 1357

<210> 4
 <211> 1121
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 4
 aagctctaag tatgaatttt tttaatatcg gaacttctaa aatattttca gaaaattttc 60
 aaaataattt gatctactca attttttcc ggtggggttc gatattcggg aatgaagtaa 120
 tatctcatac aacactttt tctcaagact agatcatacg ggacacaaaat ttgaattatt 180
 ataattaata accaaaaata tgaaaatatg acattaaaaa caatagcgtc taattattcc 240
 cgttggtatac attaactaat ccaaaccaaa atattgtcat tcttggtgat gaaaagtatg 300
 tatggtaatc gcaagggtac gcaaaataat cgatacaatt tgcataatct gttgaattt 360
 aaaagaagaa aaataaattt attgctattt ttataaacat atgattcctg agagataaaaa 420
 gaaataaagc gaatcgtatg gaatcattt aatcaaataa aaacaaactc gtagataaat 480
 gttccacaaa gataaaatat tacgattttt ttccataagcc cttcaatatt cagtgaatcg 540
 atttcttcta tcaacgtttt ttcaatgtat ttgcacaac ggagttgctc aaagcagct 600
 ttatatgatt tgcaagtaaa tgccatcatg caatttatcg gggggcaccg gaagaatagc 660
 ttacccattt attttttaa aaaaagatta agtacaatac catgatgtgg attgttaagtt 720
 gtgctcaaca agtacaataa attaatcgac accaaataat ggacagtatt ttcaatgtc 780
 acacatatac caacttttaa atattaattt tatcaatttt tcacaaccaa aagaaatgaa 840
 caaacaacat tcttgcagt caacaaataa tcgattcaaa gtttagaaat aggtgagtc 900
 agcaaatgtg tatgaatagt ttatgacttc ccattatctc aaaaccaacc ttatggaaac 960
 agcattaacc aaaaaacggc tgatatgttt ggattattha atttctaatt tatcaaatac 1020
 catgttagtt atgttatata aagtccatac tcctccattc taaaacacac aagaaaaaga 1080
 aaaacaaaga tatatctagc cttagaatcc aattcttctc c 1121

<210> 5
 <211> 891
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 5
 taattattcc cgttggtatac attaactaat ccaaaccaaa atattgtcat tcttggtgat 60
 gaaaagtatg tatggtaatc gcaagggtac gcaaaataat cgatacaatt tgcataatct 120
 gtttgaattt aaaaagaa aaataaattt attgctattt ttataaacat atgattccctg 180
 agagataaaa gaaataaagc gaatcgtatg gaatcattttt aatcaaataa aaacaaactc 240
 gtatataat gttccacaaa gataaaatat tacgattttt ttccataagcc cttcaatatt 300
 cagtgaatcg atttcttcta tcaacgtttt ttcaatgtat ttgcacaac ggagttgctc 360
 aaagcagctt ttatatgatt tgcaagtaaa tgccatcatg caatttatcg gggggcaccg 420
 gaagaatagc ttacccattt attttttaa aaaaagatta agtacaatac catgatgtgg 480
 attgttaagtt gtgctcaaca agtacaataa attaatcgac accaaataat ggacagtatt 540
 ttatgttcaatgtc acacatatac caacttttaa atattaattt tatcaatttt tcacaaccaa 600
 aagaaatgaa caaacaacat tcttgcagt caacaaataa tcgattcaaa gtttagaaat 660
 aggtgagtc agcaaatgtg tatgaatagt ttatgacttc ccattatctc aaaaccaacc 720
 ttatgttcaatgtc acacatatac caacttttaa atattaattt tatcaatttt tcacaaccaa 780
 tatcaaatac catgttagtt atgttatata aagtccatac tcctccattc taaaacacac 840
 aagaaaaaga aaaaacaaaga tatatctagc cttagaatcc aattcttctc c 891

<210> 6
 <211> 575
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<400> 6
 tctatcaacg tttttcagt tgatttgca caacggagtt gctcaaagca gcttttat 60
 gatttgcaag taaatgcaca tgagcaattt atcggcgccc acccgaagaa tagcttaccc 120
 attttatttt taaaaaaaag attaagtaca ataccatgtat gtggattgtat agttgtgctc 180
 aacaagtaca aataattaat cgacacccaa taatggacag tatttggtaa gcctacacat 240
 atctcaactt ttaaatatta attttatcaa ttttcacaa cccaaagaaaa tgaacaaaca 300
 acattcttgc aagtcacaa ataatcgatt caaagttagt aaataggtga gtcaagcaaa 360
 tggatgaa tagtttatga cttccattt tctcaaaacc aaccttagtg gaacagcatt 420
 aaccaaaaaa cggctgatata ttttggattttt aatttatcaa atcacatgtt 480
 agttatgtta tataaagtcc taattccctcc attctaaaac acacaagaaa aagaaaaaca 540
 aagatataatc tagccttaga atccaatttct tctcc 575

<210> 7
 <211> 1420
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum

<220>
 <221> CDS
 <222> (256)..(1197)

<400> 7
 taaacaaaga tataatctagc cttagaatcc aattcttctc aatgggaagc caaataaaaga 60
 agcaatggct tcaatttgct tgcattttga cattttctt gattgccaca tgctctatgg 120
 catattcacc ttacaattct tatgaatcat cagactcaac atataataaa gtaccaacca 180
 cagtagtcaa aagtgaagac ttcaaggtagc cctcagagtc ggaaaaggaa tataagtctgt 240
 catttttgc aaaaa atg att act ata aga agc cat caa ttt cag agg ata 291
 Met Ile Thr Ile Arg Ser His Gln Phe Gln Arg Ile
 1 5 10

act ata aga aag tat cat ttg ttc ccg aac atg aat cat tcc tgc caa 339
 Thr Ile Arg Lys Tyr His Leu Phe Pro Asn Met Asn His Ser Cys Gln
 15 20 25

aga atg act act aca aga agc cat tat ttt ccg aag ata act aca aga 387
 Arg Met Thr Thr Arg Ser His Tyr Phe Arg Lys Ile Thr Thr Arg
 30 35 40

agg agt cat atg ttc aag agg tac cct cga agg cta aac cag aat ata 435
 Arg Ser His Met Phe Lys Arg Tyr Pro Arg Arg Leu Asn Gln Asn Ile
 45 50 55 60

agg agt cat ttt ttt caa aat ttg act act tca aga agc cat cat ttt 483
 Arg Ser His Phe Phe Gln Asn Leu Thr Thr Ser Arg Ser His His Phe
 65 70 75

tcg aag aca act aca aga acg acg tca tat gtt cca aag gta ccc tcg 531
 Ser Lys Thr Thr Arg Thr Ser Tyr Val Pro Lys Val Pro Ser
 80 85 90

5/9

atg gct aaa cca gaa tat aag gag tca ttt ttt cca aaa ttt gac tac	579
Met Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Glu Ser Phe Phe Pro Lys Phe Asp Tyr	
95 100 105	
ttt aag aag cca tca gtt tca gaa gat aac tac aag aag acg tca tat	627
Phe Lys Lys Pro Ser Val Ser Glu Asp Asn Tyr Lys Lys Thr Ser Tyr	
110 115 120	
gtt tca gag gtg ccc tcg atg gct aaa cca gaa tat aag gag tca ttt	675
Val Ser Glu Val Pro Ser Met Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Glu Ser Phe	
125 130 135 140	
ttt cca aaa ttt gac tac ttt aag aag tca tta gct cct gaa gat aaa	723
Phe Pro Lys Phe Asp Tyr Phe Lys Lys Ser Leu Ala Pro Glu Asp Lys	
145 150 155	
tac aag aag gcg cca tat gtt cca gag gta tcc aca gag cct aaa ccg	771
Tyr Lys Lys Ala Pro Tyr Val Pro Glu Val Ser Thr Glu Pro Lys Pro	
160 165 170	
gaa tac aag gta cca tct ttg cca aag aat gac tac tat aag aag cca	819
Glu Tyr Lys Val Pro Ser Leu Pro Lys Asn Asp Tyr Tyr Lys Lys Pro	
175 180 185	
aca att cca gaa gat aac tat aaa aag gtg tca tat gtt tca aag gtg	867
Thr Ile Pro Glu Asp Asn Tyr Lys Lys Val Ser Tyr Val Ser Lys Val	
190 195 200	
ccc tca gtg cct aaa gaa gaa tac aag gca cct act ttg cca aag aat	915
Pro Ser Val Pro Lys Glu Glu Tyr Lys Ala Pro Thr Leu Pro Lys Asn	
205 210 215 220	
gat tac tac aag aag cca tca gtt caa gaa aac tac aaa aag gta	963
Asp Tyr Tyr Lys Lys Pro Ser Val Gln Glu Glu Asn Tyr Lys Lys Val	
225 230 235	
cca ctt att tca aag ctg ccc tca gtg cct aaa gaa gaa tac aag gtg	1011
Pro Leu Ile Ser Lys Leu Pro Ser Val Pro Lys Glu Glu Tyr Lys Val	
240 245 250	
cct tct ttg tca aaa aaa gac tac tac aag aag cca tta gtt tct gaa	1059
Pro Ser Leu Ser Lys Lys Asp Tyr Tyr Lys Lys Pro Leu Val Ser Glu	
255 260 265	
gat aac tac aaa aag gtt tca tat gtt cca aag gtg ccc tcc gtg cct	1107
Asp Asn Tyr Lys Lys Val Ser Tyr Val Pro Lys Val Pro Ser Val Pro	
270 275 280	
aaa gaa gaa tac aag gcc cct tct ttg tca aag aat gac tac tac aag	1155
Lys Glu Glu Tyr Lys Ala Pro Ser Leu Ser Lys Asn Asp Tyr Tyr Lys	
285 290 295 300	
aag tca tcg cct tct cca tca cca cca cct cca tat tat	1197
Lys Ser Ser Pro Ser Pro Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Tyr	
305	
taaatttctt ttcatgttaa gcatggctgt ttaattaaag tccttctcca gctcaacatt 1257	
tataactcat ggagttctca tattatgagt tagaaggcat gatataaaaa tttgcattta 1317	

<210> 8
<211> 314
<212> PRT
<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 8
Met Ile Thr Ile Arg Ser His Gln Phe Gln Arg Ile Thr Ile Arg Lys
1 5 10 15

Tyr His Leu Phe Pro Asn Met Asn His Ser Cys Gln Arg Met Thr Thr
 20 25 30

Thr Arg Ser His Tyr Phe Arg Lys Ile Thr Thr Arg Arg Ser His Met
35 40 45

Phe Lys Arg Tyr Pro Arg Arg Leu Asn Gln Asn Ile Arg Ser His Phe
50 55 60

Phe Gln Asn Leu Thr Thr Ser Arg Ser His His Phe Ser Lys Thr Thr
 65 70 75 80

Thr Arg Thr Thr Ser Tyr Val Pro Lys Val Pro Ser Met Ala Lys Pro
85 90 95

Glu Tyr Lys Glu Ser Phe Phe Pro Lys Phe Asp Tyr Phe Lys Lys Pro
 100 105 110

Ser Val Ser Glu Asp Asn Tyr Lys Lys Thr Ser Tyr Val Ser Glu Val
 115 120 125

Pro Ser Met Ala Lys Pro Glu Tyr Lys Glu Ser Phe Phe Pro Lys Phe
 130 135 140

Asp Tyr Phe Lys Lys Ser Leu Ala Pro Glu Asp Lys Tyr Lys Lys Ala
 145 150 155 160

Pro Tyr Val Pro Glu Val Ser Thr Glu Pro Lys Pro Glu Tyr Lys Val
165 170 175

Pro Ser Leu Pro Lys Asn Asp Tyr Tyr Lys Lys Pro Thr Ile Pro Glu
 180 185 190

Asp Asn Tyr Lys Lys Val Ser Tyr Val Ser Lys Val Pro Ser Val Pro
 195 200 205

Lys Glu Glu Tyr Lys Ala Pro Thr Leu Pro Lys Asn Asp Tyr Tyr Tyr Lys
 210 215 220

Lys Pro Ser Val Gln Glu Glu Asn Tyr Lys Lys Val Val Pro Leu Ile Ser
 225 230 235 240

Lys Leu Pro Ser Val Pro Lys Glu Glu Tyr Lys Val Pro Ser Leu Ser
 245 250 255

Lys Lys Asp Tyr Tyr Lys Lys Pro Leu Val Ser Glu Asp Asn Tyr Lys

7/9

260 265 270

Lys Val Ser Tyr Val Pro Lys Val Pro Ser Val Pro Lys Glu Glu Tyr
 275 280 285

Lys Ala Pro Ser Leu Ser Lys Asn Asp Tyr Tyr Lys Lys Ser Ser Pro
 290 295 300

Ser Pro Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Tyr
 305 310

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 9
 gagagtgcac gatatcgggc gaattgggtta cc 32

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 10
 gagatctaga ggtaccggac tttatataac ataac 35

<210> 11
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 11
 gagatctaga ccatggagaa gaattgg 27

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstlich

<400> 12
 gagagtgcac gggcgaattg ggtaccg 27

<210> 13
<211> 3259
<212> DNA
<213> *Lycopersicon esculentum*

9/9

gtcctaattc ctccattcta aaacacacaa gaaaaagaaa aacaaagata tatctagcct 3240
tagaatccaa ttcttctca 3259

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/08786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C12N15/11	C12N15/29	C12N15/82	C12N1/21	C12N5/10
	A01H5/06	A01H5/00	A01H5/10	C12Q1/68	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19 September 1991 (1991-09-19) the whole document ----	12-14
X	BUCHER M ET AL: "Two genes encoding extension-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, (1997 NOV) 35 (4) 497-508. , XP000882011 the whole document ----	12-14 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

15 March 2000

Date of mailing of the International search report

27/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Billang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 99/08786

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LAUTER F -R: "ROOT-SPECIFIC EXPRESSION OF THE LERSE-1 GENE IN TOMATO IS INDUCED BY EXPOSURE OF THE SHOOT TO LIGHT" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, DE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, vol. 252, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 751-754, XP002911926 ISSN: 0026-8925 the whole document</p> <p>—</p>	
A	<p>CONKLING M ET AL: "Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco" PLANT PHYSIOLOGY, US, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, vol. 93, no. 3, 1 July 1990 (1990-07-01), pages 1203-1211, XP002080227 ISSN: 0032-0889 the whole document</p> <p>—</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**Information on patent family members**

Int'l. Appl. No.

PCT/EP 99/08786

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9113992	A 19-09-1991	CA 2078327	A 17-09-1991	EP 0521910 A 13-01-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Patentzeichen

PCT/EP 99/08786

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES	IPK 7 C12N15/11 C12N15/29 C12N15/82 C12N1/21 C12N5/10	A01H5/06 A01H5/00 A01H5/10 C12Q1/68
---	---	-------------------------------------

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 91 13992 A (CAMBRIDGE ADVANCED TECH ;RHONE POULENC LTD (GB); TWYFORD SEEDS LTD) 19. September 1991 (1991-09-19) das ganze Dokument ---	12-14
X	BUCHER M ET AL: "Two genes encoding extension-like proteins are predominantly expressed in tomato root hair cells." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, (1997 NOV) 35 (4) 497-508. , XP000882011 das ganze Dokument ---	12-14 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Ablaufdatum des Internationalen Recherchenberichts

15. März 2000

27/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intell. nationales Altenzeichen

PCT/EP 99/08786

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LAUTER F -R: "ROOT-SPECIFIC EXPRESSION OF THE LERSE-1 GENE IN TOMATO IS INDUCED BY EXPOSURE OF THE SHOOT TO LIGHT" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, DE, SPRINGER VERLAG, BERLIN, Bd. 252, 1. Januar 1996 (1996-01-01), Seiten 751-754, XP002911926 ISSN: 0026-8925 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	
A	<p>CONKLING M ET AL: "Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco" PLANT PHYSIOLOGY, US, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, Bd. 3, Nr. 93, 1. Juli 1990 (1990-07-01), Seiten 1203-1211, XP002080227 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08786

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9113992 A	19-09-1991	CA	2078327 A	17-09-1991